

Différences variétales de sensibilité de l'arachide à la contamination par *A. flavus* aux champs et en conditions artificielles

Ch. ZAMBETTAKIS (1), A. BOCKELÉE-MORVAN (2), F. WALIYAR (3) et J. ROSSION (4)

Résumé. — Trente-trois variétés d'arachide de divers types et de diverses provenances dont les variétés résistantes à la contamination par *Aspergillus flavus* PI 337-394 P et PI 337-409 ont été cultivées en 1975, aux champs à la Station de Darou (Sénégal), dans des conditions de sécheresse très favorables à la contamination dans le sol. Deux dates de semis et deux dates de récolte ont été réalisées pour chaque variété. Des différences significatives des taux de contamination à la récolte des gousses d'une part (de 0,8 à 8 p. 100), des graines d'autre part (de 0,4 à 4 p. 100) ont été trouvées entre variétés. Dans les 10 variétés les moins contaminées on trouve les deux PI résistantes, Florunner, et 7 variétés sélectionnées au Sénégal pour leur résistance à la sécheresse. Le test biologique de sensibilité par inoculation artificielle effectué au laboratoire du Muséum de Paris rend compte dans une large mesure des taux de contamination naturelle observés. Toutefois les résultats du test varient fortement et significativement pour certaines variétés en fonction des conditions de culture (dates de semis et de récolte).

Mots clés : Arachide, Sénégal, *Aspergillus flavus*, Aflatoxine, Variétés, Résistance.

Dans une précédente étude [3] des différences de comportement variétales de l'arachide à la contamination par *Aspergillus flavus* avaient été observées soit au Laboratoire, soit dans un essai aux champs réalisé au Sénégal.

En 1975, un nouvel essai a été implanté sur la Station de Darou de l'Institut sénégalais de Recherches agricoles (5), avec de nouvelles variétés sénégalaises, ou introduites, parmi lesquelles PI 337-394 P et PI 337-409, trouvées les plus résistantes par Mixon [1] sur 1 200 variétés testées par contamination artificielle, l'évaluation étant faite par comptage des graines où le champignon a traversé le tégument séminal et s'est développé sur les cotylédons, et PI 886 (ou US 26) reconnue résistante par Rao [2], l'évaluation de la contamination étant faite par analyse d'aflatoxine dans les graines.

sauf pour certaines variétés pour lesquelles on ne disposait pas de semences en quantités suffisantes et pour lesquelles on n'a pu réaliser les quatre traitements.

La pluviométrie a été de 766 mm, légèrement supérieure à la moyenne (716 mm), mais irrégulière en septembre et octobre si bien que les premiers semis ont subi également des périodes de sécheresse en fin de cycle.

Finalement les conditions à la récolte pour le 1^{er} et le 2^e semis étaient assez voisines comme l'indique la teneur en eau moyenne des coques et des graines à la récolte, mesurée sur un échantillon de chaque variété (Tabl. I).

TABLEAU I. — Teneur en eau (Humidity) p. 100

	Coques (Shells)	Graines (Seeds)
1 ^{er} semis, récolte à — 15 jours . (1st. sowing, harvest a fortnight early)	53,5	42,3
1 ^{er} semis, récolte à maturité . . (1st. sowing, harvest when ripe)	33,1	30,3
2 ^e semis, récolte à — 15 jours . (2nd. sowing, harvest a fortnight early)	45,0	40,0
2 ^e semis, récolte à maturité . . . (2nd. sowing, harvest when ripe)	30,5	29,0

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'essai implanté à Darou comportait 33 variétés d'arachides de types divers (Virginia, Virginia à grosses graines, Spanish, Valencia) et de cycle variable. Il comprenait deux séries, l'une semée normalement en début de saison des pluies (17 juillet), l'autre semée tardivement (8 août), le semis tardif et la sécheresse de fin de cycle ayant été reconnus antérieurement comme favorables à la contamination des gousses dans le sol par *Aspergillus flavus*.

Chaque série comportait deux subdivisions, l'une récoltée à bonne maturité, l'autre quinze jours avant la date théorique de maturité en fonction de la longueur du cycle de chaque variété.

L'essai comportait donc 132 parcelles de 3 × 6 m

(1) Maître de Recherche au C. N. R. S., Laboratoire de Cryptogamie du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris (L. A. 257 C. N. R. S.).

(2) Département Oléagineux Annuels, I. R. H. O. Paris.

(3) Assistant au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum.

(4) Ingénieur à l'I. R. H. O., Station I. S. R. A. de Darou (Sénégal).

(5) Dans le cadre du Projet « Ministère du Développement Rural/F. E. D. » de Développement de la culture de l'arachide de bouche dans le Siné-Saloum (Sénégal).

A chaque prélèvement, 300 gousses de chaque variété (parfois plus si le pourcentage de gousses vides était important) ont été expédiées immédiatement au Laboratoire du M. N. H. N., enveloppées dans du papier journal qui absorbe l'excès d'humidité et est légèrement antimicrobien. L'ensemble des gousses de chaque récolte a été, dès réception, exposé à l'air pour compléter le séchage. On a examiné aussitôt et compté les colonies d'*A. flavus* au stéréoscope binoculaire.

Après examen du taux d'infection externe des gousses, celles-ci ont été décortiquées dans la même journée pour chaque récolte et on a noté aussitôt le nombre

de graines portant des colonies d'*Aspergillus flavus* visibles sur le tégument séminal des graines.

Les graines ont été laissées à l'air et on a mesuré un mois plus tard la contamination : de nouvelles colonies, non visibles au décorticage, pouvant s'être développées pendant le séchage naturel des graines (le premier examen au décorticage intervenant entre 10 et 30 jours après la récolte, selon les échantillons).

Les graines saines ont été ensuite utilisées pour le test biologique d'extension du champignon après inoculation artificielle. Le test d'inoculation artificielle des graines a été effectué sur 4 répétitions de 25 graines saines pour chaque variété, et pour chacune des deux dates de récolte à maturité. Pour quatre variétés, Florunner, 55-437, GH 119-20, PI 337-394P, il a été également effectué sur les graines récoltées 15 jours avant maturité.

Les graines ont été infectées par trempage dans une suspension aqueuse de spores âgées de 15 jours à la concentration de 400 000 par goutte, puis placées en boîte de Pétri sur papier filtre imbibé d'eau (2 cm³ par boîte de 25 graines, renouvelé tous les 2 jours). L'inoculum était constitué à partir d'un mélange de 4 souches d'*Aspergillus flavus* locales produisant de l'aflatoxine. Les notations des graines portant des

colonies d'*A. flavus* ont commencé le 5^e jour et ont été poursuivies jusqu'au 20^e jour après l'ensemencement.

II. — CONTAMINATION NATURELLE DES GOUSSES

On a examiné en général 1 200 gousses par variété (300 à chaque récolte) avec certaines variations. Le tableau II indique le nombre moyen de colonies d'*A. flavus* observées, rapporté à 1 000 gousses.

La contamination varie de façon importante selon les variétés, dans le rapport de 1 à 10. Dix variétés ont un taux de gousses contaminées inférieur à 30 p. 1 000 : Florunner, 55-437, 47-16, PI 337-394 P, PI 337-409, 57-422, 70-112, 73-30, 59-127, et 73-33. Ces 10 variétés ne diffèrent pas entre elles statistiquement, toutes les autres variétés ayant un taux de contamination significativement supérieur à la 73-30 qui est la moins contaminée avec un taux de 8,3 p. 1 000.

Si les différences entre variétés sont importantes, les différences entre dates de récolte le sont relativement peu (Tabl. III).

TABLEAU II. — Caractéristiques des variétés et contamination naturelle des gousses à la récolte

(Characteristics of varieties and natural contamination of pods on harvesting)

Variétés (Varieties)	Type (1)	Port (Habit) (2)	Cycle à (at) Darou (jours-days)	Poids de 100 graines (Weight of 100 seeds) (g)	Nb. colonies <i>A. flavus</i> /1 000 gousses (/1,000 pods)
Florunner	V	R	110	50-60	17,5
EH 273-2-15	V	E	115-120	65-75	45,8
55-437	S	E	95-100	30-40	21,0
28-206	V	E	115-120	45-55	36,6
47-16	V	R	115-120	30-40	23,2
NC-17	V	E	110	60-70	31,7
GH 119-20	V	E	115-120	75-85	71,4
Tifton 8	V	E	115-120	75-85	71,4
Shulamit	V	E	125	70-80	64,5
UF 72-513	Va	E	95-100	30-40	35,1
PI 337-394 P	Va	E	95-100	30-40	28,7
PI 337-409	Va	E	95-100	30-40	12,3
Fla 393-9	V	E	110	70-80	70,0
Darou IV	V	R	115-120	50-60	51,7
Florigiant	V	R	110	70-80	63,2
EH 235-2-2	V	E	115-120	65-75	(52) (3)
EH 310-9	V	E	125	55-65	40,7
EH 303-4	V	E	115-120	60-70	56,3
EH 282 b 2	V	E	115-120	70-80	71,4
R 295 b 1	V	E	115-120	60-70	81,3
EH 349 b	V	E	115-120	60-70	47,2
EH 301-13	V	E	115-120	60-70	46,7
NC 5	V	E	125	70-80	64,7
PI 343-319	V	E	110	55-65	(88) (4)
US 26	S	E	95-100	30-40	46,1
EH 304 b 16	V	E	115-120	60-70	37,2
756 A	V	E	125	65-75	44,6
Fla 393-6	V	E	110	70-80	35,9
57-422	V	E	110	60-70	21,4
70-112	V	E	110	40-50	19,0
73-30	S	E	95-100	30-40	8,3
59-127	V	E	115-120	45-55	13,8
73-33	V	E	115-120	45-55	17,0
PPDS (L. s. d.) 5 p. 100					26,2
PPDS (L. s. d.) 1 p. 100					34,6

(1) Type = V : Virginia ; S : Spanish ; Va : Valencia.

(2) Port (Habit) = R : Rampant (Creeping) ; E : Erigé (Erect).

(3) Moyenne de 3 récoltes (Mean of 3 harvests),

(4) Moyenne de 2 récoltes (Mean of 2 harvests),

ces variétés ne sont pas incluses dans l'interprétation statistique (These varieties are not included in the statistical interpretation).

TABLEAU III. — Nombre moyen de gousses contaminées pour 1 000 gousses
(Mean number of contaminated pods per 1,000)

1 ^{er} semis, récolte à — 15 jours (1st sowing, harvest a fortnight early)	35,6
1 ^{er} semis, récolte à maturité (1st sowing, harvest when ripe)	42,8
2 ^e semis, récolte à — 15 jours (2nd sowing, harvest a fortnight early)	46,9
2 ^e semis, récolte à maturité (2nd sowing, harvest when ripe)	42,6

Le taux moyen de contamination est le même pour les deux récoltes à maturité, il est inférieur pour la récolte à — 15 jours du 1^{er} semis, supérieur pour la récolte à — 15 jours du second semis.

III. — CONTAMINATION NATURELLE DES GRAINES

On a examiné environ 2 000 graines par variété (environ 500 pour chaque date de récolte) provenant

TABLEAU IV. — Contamination naturelle des graines (en p. 1 000) et mauvaises graines (p. 100)
(moyenne des 4 récoltes)

(Natural contamination of seeds-in p. 1,000 — and bad seeds - p. 100 — mean of 4 harvests)

Variétés (Varieties)	Contamination	Mauvaises graines (Bad seeds)	Variétés (Varieties)	Contamination	Mauvaises graines (Bad seeds)
Florunner	3,8	4,0	EH 303-4	34,7	25,4
EH 273-2-15	21,8	18,1	EH 282 b2	37,2	16,8
55-437	5,1	5,9	R 295 b1	47,3	11,6
28-206	13,0	15,3	EH 349 b	22,5	24,4
47-16	7,2	3,4	EH 301-13	17,9	18,7
NC-17	12,0	12,3	NC 5	36,6	22,0
GH 119-20	35,5	22,4	US 26	23,5	29,8
Tifton 8	23,6	21,6	EH 304-b16	25,0	19,7
Shulamit	21,0	17,9	756 A	21,8	7,8
UF 72-513	11,5	23,6	Fla 393-6	16,9	16,3
PI 337-394 P	8,8	30,0	57-422	8,9	6,5
PI 337-409	5,1	7,8	70-112	8,4	7,2
Fla 393-9	46,1	23,0	73-30	4,2	10,2
Darou IV	24,5	22,3	59-127	6,5	10,9
Florigiant	30,9	14,1	73-33	7,8	8,2
EH 310-9	30,8	14,7			

PPDS (L. s. d.) 5 p. 100 = 21,5 ; 1 p. 100 = 28,5 (pour la (for the) contamination).

taux moyen de contamination est de 31 rapporté à 1 000 gousses.

Cette différence est encore plus importante si l'on considère que les 2 ou 3 graines contenues dans chaque gousse ont davantage de chances d'être contaminées qu'une graine isolée, une fois franchie la barrière de la coque par le champignon.

Les différences de taux de contamination des graines, en fonction des dates de récolte, sont relative-

TABLEAU V. — Nombre moyen de graines contaminées pour 1 000 graines

(Mean number of contaminated seeds per 1,000)

1 ^{er} semis, récolte à — 15 jours (1st sowing, harvest a fortnight early)	15,1
1 ^{er} semis, récolte à maturité (1st sowing, harvest when ripe)	22,7
2 ^e semis, récolte à — 15 jours (2nd sowing, harvest a fortnight early)	20,2
2 ^e semis, récolte à maturité (2nd sowing, harvest when ripe)	21,9

de toutes les gousses reçues et ayant fait l'objet de l'étude de la contamination externe ci-dessus.

Les graines portant des colonies d'*A. flavus* ont été dénombrées ainsi que les graines parfaitement saines et les graines dites mauvaises (avortées, immatures, moisies, etc.). Lors du décorticage, les gousses vides ont également été dénombrées.

Le taux moyen de contamination des graines pour les quatre dates de récolte (Tabl. IV) varie considérablement selon les variétés, dans le rapport d'environ 1 à 10. Dix variétés ont un taux de contamination naturelle inférieure à 10 p. 1 000, il s'agit des mêmes variétés déjà notées comme ayant un très faible nombre de gousses contaminées (Fig. 1).

Les observations montrent que les gousses qui contiennent, après décorticage, une ou plusieurs graines contaminées, présentent généralement des colonies externes d'*A. flavus* visibles sur la coque. Par contre, toutes les colonies visibles à l'extérieur de la gousse ne se retrouvent pas sur les graines. On trouve, en effet, pour l'ensemble des échantillons, 42 gousses contaminées pour mille, alors que sur les graines le

ment peu importantes ; le taux moyen de contamination est très voisin pour les trois dernières récoltes et inférieur pour la première.

Si l'on rapproche le taux de contamination de la teneur en eau des graines à la récolte, le premier prélèvement, plus humide, est également le moins contaminé et semble donc avoir bénéficié de conditions moins favorables à la contamination dans le sol.

L'examen des données, par variété, montre cependant que des variétés très peu contaminées avaient des teneurs en eau très faibles à la récolte, et inversement (Tab. VI).

Les conditions écologiques de la campagne ont fait que les quatre séries d'échantillons prélevés se sont trouvés avant récolte dans des conditions de contamination en moyenne assez comparables. L'interprétation statistique des taux de contamination pour les gousses et pour les graines montre qu'il existe des différences significatives entre les variétés aux champs.

La corrélation entre la contamination externe des gousses (Tabl. II) et la contamination des graines

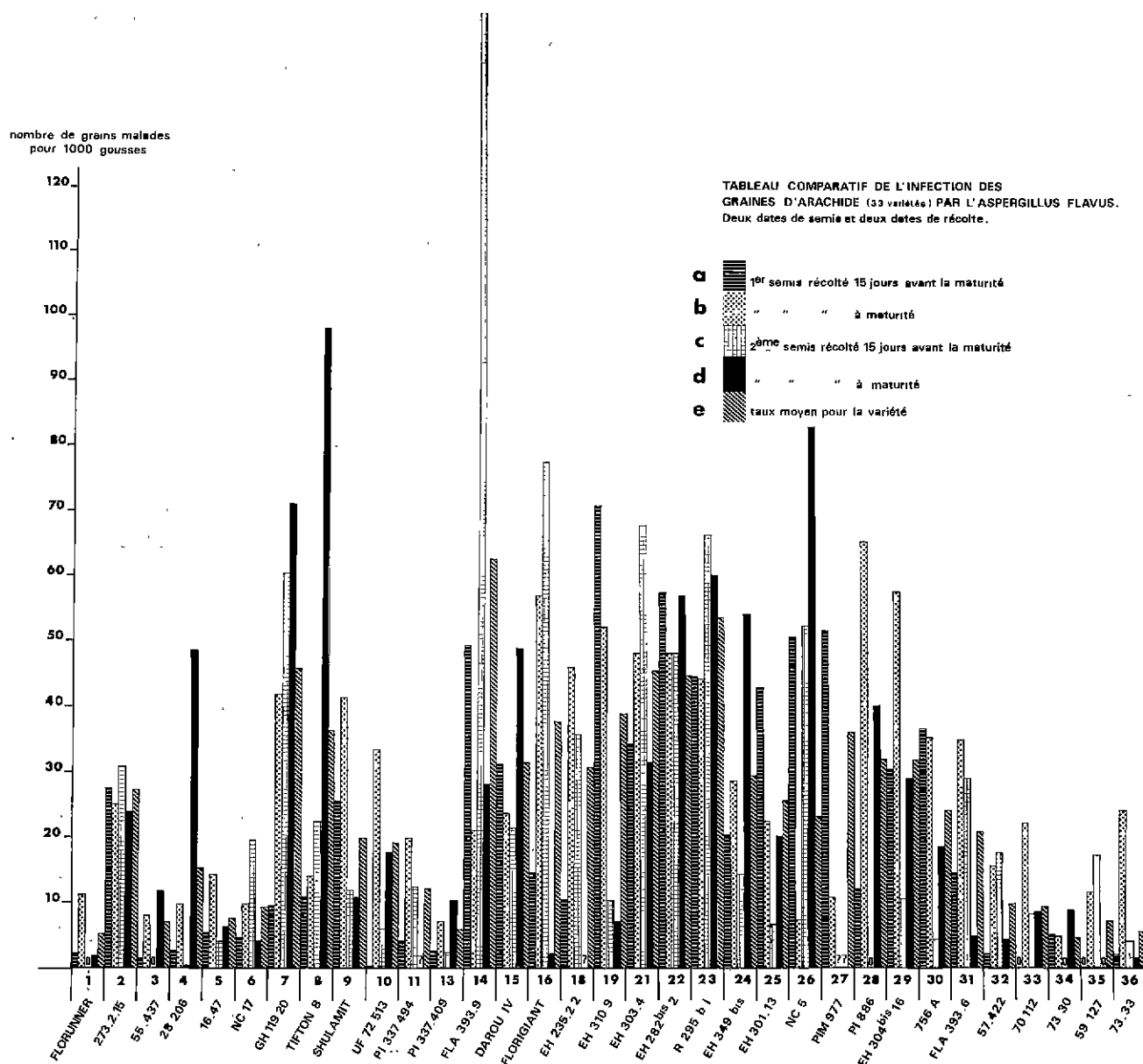


FIG. 1. — Comparison of infection of groundnut seeds (33 varieties) by *Aspergillus flavus* (in number of diseased seeds per 1,000 pods) — 2 sowing dates and 2 harvesting dates. a — 1st sowing harvested two weeks before ripening ; b — 1st sowing harvested when ripe ; c — 2nd sowing harvested two weeks before ripening ; d — 2nd sowing harvested when ripe ; e — mean for the variety.

TABLEAU VI

	Teneur en eau moyenne des 2 récoltes à maturité (Mean moisture content of the 2 harvests when ripe)	Taux de contami- nation des graines (p. 1 000) à maturité (Rate of seed contamination per 1,000 when ripe)
Florunner	16,4	0,9
47-16	20,4	5,2
73-33	18,1	2,7
55-437	34,0	6,1
PI-337-409	34,0	9,8
Tifton 8	38,1	38,1
Fla 393-9	38,4	66,1
R 295-B ₁	26,6	58,1

(Tabl. IV) est hautement significative ($R = 0,90^{***}$) comme le laissent prévoir les observations faites sur les gousses et sur les graines immédiatement après le décorticage.

La corrélation entre le taux de mauvaises graines (Tabl. IV) et le taux de contamination des gousses et des graines est également significative ($R = 0,49^{**}$ et $0,54^{**}$ respectivement), bien que moins étroite. Ceci s'explique par le fait que dans les mauvaises graines sont incluses les graines ridées, non mûres, qui sont plus importantes dans les récoltes à — 15 jours, surtout pour le 1^{er} semis où le taux de contamination des graines est le plus faible.

Par contre, on n'a pas trouvé de corrélation significative entre le taux de gousses vides et la contamination par *A. flavus*, bien que fréquemment les variétés les plus contaminées soient celles qui ont un pourcentage de gousses vides important.

IV. — TEST DE CONTAMINATION ARTIFICIELLE

Les résultats de ce test figurent au tableau VII. On observe des différences importantes de contamination, cinq variétés sont nettement moins infestées (taux moyen inférieur à 20 p. 100) que ce soit pour les graines issues du 1^{er} ou du 2^e semis.

Parmi elles se trouvent les deux variétés signalées par Mixon : PI 337-394 P et PI 337-409, testées selon une méthode voisine de la nôtre, mais avec une souche pure d'*A. flavus*. Il est intéressant de noter que ces deux variétés sont également résistantes aux souches locales (Fig. 2).

La troisième, US. 26, a été reconnue résistante par Rao, l'évaluation étant faite par analyse d'aflatoxine dans les graines. Les 2 autres variétés peu sensibles dans ce test, 55-437 et 73-30 sont cultivées au Sénégal

TABLEAU VII. — Test d'inoculation artificielle sur graines récoltées à maturité

(Artificial inoculation test — on seeds harvested when ripe)
p. 100

Variétés (Varieties)	Semis	(Sowing)	Ensemble (Mean of all)
	1	2	
Florunner	65	89	77
EH 273-2-15	28	97	62,5
55-437	4	16	10
28-206	33	28	30,5
47-16	36	60	48
NC-17	85	100	92,5
GH 119-20	69	72	70,5
Tifton 8	70	100	85
Shulamit	67	72	69,5
UF 72-513	26	39	32,5
PI 337-394 P	21	11	16
PI 337-409	2	7	4,5
Fla 393-9	85	63	74
Darou IV	38	60	49
Florigiant	97	100	98,5
EH 235-2-2 (1)	(46)	(80)	(63)
EH 310-9	70	100	85
EH 303-4	71	94	82,5
EH 282-b 2	60	97	78,5
R 295-b 1	90	90	90
EH 301-13	56	41	48,5
EH 349-b	93	84	88,5
NC 5	96	96	96
PI 343-319 (1)	(87)	(100)	(93,5)
US 26	15	5	10
EH 304-b 16	82	92	87
756 A	91	95	93
Fla 393-6	94	100	97
57-422	96	100	98
70-112	23	28	25,5
73-30	22	14	18
59-127	86	47	66,5
73-33	56	35	45,5
Moyenne (Mean)	59,2	66,8	63,0

Comparaison entre variétés (Comparison between varieties)

PPDS (L. s. d.) 5 p. 100	19,2	13,4	12,2
— — 1 p. 100	25,6	17,8	16,2

Comparaison entre dates de semis (Comparison between sowing dates):

- sur la moyenne (on the mean) : PPDS (L. s. d.) 5 p. 100 = 2,6 ; 1 p. 100 = 3,4.
- pour une même variété (for the same variety) : PPDS (L. s. d.) 5 p. 100 = 15,0 ; 1 p. 100 = 19,8.

(1) Test effectué sur graines récoltées 15 jours avant maturité (Test carried out on seeds harvested 15 days before the date of ripening).



FIG. 2 : Un exemple du test biologique par inoculation artificielle des graines (An example of the biological test by inoculation of the seeds). a : variété résistante (resistant variety) — PI 337409 ; b : variété sensible (sensitive variety) — 59-127.

où elles ont été sélectionnées pour leur résistance à la sécheresse.

Un second groupe de 7 variétés a un taux d'infestation compris entre 20 et 50 p. 100. Il comprend une Virginia semi-tardive (73-33), une Valencia (UF 72-513), trois Virginia à cycle long (28-206, 47-16, 70-112) et deux Virginia à grosses graines (EH 301-13 et Darou IV).

Toutes les autres variétés ont un taux d'infestation supérieur à 60 p. 100, un certain nombre étant proche de 100 p. 100.

On observe que les graines issues du 2^e semis sont, en moyenne, davantage infestées que celles issues du 1^{er} semis (respectivement 66,8 et 59,2 p. 100), la différence étant significative à 1 p. 100.

En comparant les taux d'infestation par variété pour les deux dates de semis, on note que pour 18 variétés sur 33 testées il n'y a pas de différence significative entre 1^{er} et 2^e semis, parmi lesquelles les 5 variétés qui sont les moins sensibles.

Dix variétés se montrent significativement plus sensibles pour les graines issues du 2^e semis que pour celles issues du 1^{er} semis : Florunner, EH 273-2-15, 47-16, NC 17, Tifton 8, Darou IV, EH 235-2-2, EH 310-9, EH 303-4, EH 282 b 1.

Quatre variétés se montrent au contraire significativement moins sensibles pour les graines issues du 2^e semis : Fla 393-9, EH 301-13, 59-127, 73-33.

Pour quatre variétés, Florunner, 55-437, PI 337-394 P et GH 119-20, le test a été réalisé, dans les mêmes conditions, pour les 4 dates de récolte (Tabl. VIII). On note que PI 337-394 P récoltée avant maturité pour le premier semis est nettement moins sensible qu'à maturité, alors que c'est l'inverse pour 55-437 qui est significativement beaucoup plus sensible, dans les mêmes conditions.

Il est possible que les graines, très humides à ce

moment, se soient rétractées en se desséchant rapidement, ce qui entraînerait des cassures du tégument séminal favorables à la pénétration de l'A. *flavus*.

Ces observations montrent que l'état de la graine au moment du test est un élément important, la structure du tégument séminal et sa résistance à la pénétration du champignon dépendant des conditions de la culture. Le test d'inoculation doit donc être de préférence pratiqué sur des graines cultivées dans les mêmes conditions pour mettre en évidence des différences de sensibilité entre les variétés.

Ceci pourrait expliquer les différences de classement de certaines variétés d'une année sur l'autre, ou d'un test à l'autre, qui ont parfois été constatées. On peut également considérer que le fait, pour une même variété, d'avoir des comportements très différents au test d'inoculation en fonction des conditions de culture est un élément défavorable.

TABEAU VIII. — Différence de sensibilité pour les 4 dates de récolte
(Difference in sensitivity for the 4 harvesting dates)

Date de récolte (of harvest)	Nomb. de graines contaminées s/25 graines (No. of contaminated seeds out of 25)				
	Variétés (Varieties)				
	Florunner	55-437	GH 119-20	PI 337-394 P	Moyenne
1 ^{er} semis = — 15 jours (1st sowing, a fortnight early)	11,7	10,7	22,5	0,7	11,4
1 ^{er} semis maturité (1st sowing, when ripe)	15,7	1,0	17,2	5,2	9,8
2 ^e semis — 15 jours (2nd sowing, a fortnight early) ..	13,0	0,2	23,7	0,5	9,4
2 ^e semis maturité (2nd sowing, when ripe)	22,2	4,0	18,0	2,7	11,7
Moyenne (Mean)	15,7	4,0	20,4	2,3	10,6
PPDS (L. s. d.) 5 p. 100	7,3	3,0	NS	3,8	
— — 1 p. 100	10,5	4,3		5,4	

V. — RELATIONS ENTRE LE TEST D'INOCULATION ET LA CONTAMINATION AUX CHAMPS

Le test d'inoculation est un moyen assez pratique (sous réserve de l'incidence des conditions de culture sur la sensibilité de certaines variétés) pour classer les variétés. D'autres facteurs interviennent aux champs et notamment la résistance de la coque à la pénétration de l'A. *flavus*.

On a cherché s'il y avait des corrélations entre les résultats du test (moyenne des deux récoltes à maturité) et les observations effectuées en contamination naturelle. Celle-ci est évidemment beaucoup plus faible puisqu'on a noté un taux maximum de 15 p. 100 (contre 100 p. 100 en contamination artificielle).

Il n'y a pas de corrélation significative entre le taux de mauvaises graines (Tabl. IV) et le test. Par contre, on trouve des corrélations significatives avec le taux de contamination naturelle des gousses ($r = + 0,53^{**}$) (Tabl. II) et le taux de contamination naturelle des graines ($r = + 0,51^{**}$) (Tabl. IV).

En général, les variétés peu sensibles au test ont une faible contamination naturelle. Ainsi 55-437, PI 337-394 P, PI 337-409 et 73-30 ont un taux de contamination naturelle inférieur à 1 p. 100. US 26, peu sensible au test, a une forte contamination naturelle sur gousses et sur graines et un pourcentage de mauvaises graines très important qui traduit une très

mauvaise adaptation aux conditions écologiques de Darou et qui favorise probablement la pénétration du champignon.

Par contre, Florunner se montre dans nos tests très sensible alors qu'elle était classée par Mixon comme étant relativement peu sensible. On a vu que sa sensibilité dépend assez fortement des conditions de culture et de récolte, et elle présente, à Darou, une faible contamination naturelle et un faible pourcentage de mauvaises graines.

Si le test biologique ne rend pas compte de tous les facteurs intervenant dans la résistance à la contamination par A. *flavus*, il est certainement un élément essentiel dans la recherche de variétés peu sensibles.

VI. — RELATIONS ENTRE LE TEST D'INOCULATION ET LA STRUCTURE DU TÉGUMENT SÉMINAL

On a étudié la structure du tégument séminal des variétés expérimentées à Darou par examen de la surface au microscope électronique à balayage et examen de coupes transversales au microscope photonique [4].

Si on compare ces observations aux résultats des tests d'inoculation artificielle effectués sur ces mêmes variétés, on constate que, dans le groupe des 5 variétés

les moins sensibles, 3 présentent une surface convexe sans cavité des cellules superficielles et les deux autres ont des cavités centrales très réduites. D'autre part, quatre d'entre elles n'ont pas montré de cassures en surface.

Les mêmes comparaisons effectuées sur les autres groupes de variétés, plus ou moins sensibles, montrent qu'en général les variétés qui ont des cellules superficielles avec de grandes et profondes cavités centrales et qui présentent des cassures en surface sont les plus contaminées. Ces observations n'ont été faites cependant qu'en petit nombre et demandent à être approfondies.

VII. — CONCLUSIONS

L'expérimentation réalisée à la Station de Darou et les observations effectuées au Muséum National d'Histoire Naturelle montrent qu'il existe des différences significatives entre les variétés testées en ce qui concerne le développement de l'*Aspergillus flavus* sur les gousses, d'une part, et sur les graines d'autre part.

Dans des conditions très favorables à la contamination dans le sol (sécheresse de fin de cycle), certaines variétés sont très peu contaminées. Le test d'inoculation artificielle, qui traduit la résistance du tégument séminal à la pénétration par le parasite, rend compte dans une large mesure des différences de contamination naturelle aux champs. Les résultats du test varient fortement, pour certaines variétés, en fonction de l'état des graines, c'est-à-dire des conditions de culture et il paraît donc nécessaire de l'effectuer sur des graines cultivées dans des conditions identiques pour classer les variétés et, pour chaque variété, sur des graines produites dans de bonnes conditions de culture et dans des conditions difficiles.

La corrélation entre le taux de mauvaises graines et le taux de contamination naturelle confirme que la bonne adaptation des variétés aux conditions écologiques des régions de culture permet de limiter les risques de contamination. Ainsi, on constate que dans les dix variétés les moins contaminées, les sept variétés sénégalaises ont été sélectionnées pour leur résistance à la sécheresse, ce qui peut contribuer à expliquer que certaines soient peu contaminées bien qu'elles soient sensibles au test d'inoculation artificielle.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MIXON A. C. et ROGERS K. M. (1973). — Peanuts resistant to seed invasion by *Aspergillus flavus*. *Oléagineux*, 28, 2, p. 85-86.
- [2] RAO K. et TULPULE P. G. (1967). — Varietal differences of Groundnut in the Production of Aflatoxin — *Nature*, Vol. 214, May 1967, p. 738-739.
- [3] ZAMBETTAKIS C. (1975). — Etude de la contamination de quelques variétés d'arachide par l'*Aspergillus flavus*. *Oléagineux*, 30, 4, p. 161-167.
- [4] ZAMBETTAKIS C. et BOCKELÉE-MORVAN A. (1976). — Recherches sur la structure du tégument séminal de la graine d'arachide et son influence sur la pénétration de l'*Aspergillus flavus*. *Oléagineux*, 31, 5, p. 219-228.

SUMMARY

Varietal Differences in Groundnut Sensitivity to Contamination by *A. flavus* in the Field and in Artificial Conditions.

Ch. ZAMBETTAKIS, A. BOCKELÉE-MORVAN, F. WALIYAR and J. ROSSION, *Oléagineux*, 1977, 32, n° 8-9, p. 377-385.

Thirty-three groundnut varieties of different types and origins, including PI 337-394 P and PI 337-409 which are resistant to contamination by *A. flavus*, were grown in the field in 1975 at the Darou Station (Senegal), in drought conditions very favourable to contamination in the soil. There were two sowing and two harvesting dates for each variety. Significant differences in the rate of contamination on harvesting of the pods on the one hand (0.8-8 p. 100) and the seeds on the other (0.4-4 p. 100) were found between varieties. Amongst the 10 least contaminated varieties are the two resistant PI, Florunner and 7 varieties selected in Senegal for their drought resistance. The biological sensitivity test by artificial inoculation carried out in the Natural History Museum in Paris explains in large measure the differences in natural contamination rates observed in the field. However, the results of the test vary considerably and significantly for certain varieties in function of the growing conditions (dates of sowing and harvesting).

RESUMEN

Diferencias varietales de sensibilidad del maní a la contaminación por *A. flavus* en el campo y en condiciones artificiales.

Ch. ZAMBETTAKIS, A. BOCKELÉE-MORVAN, F. WALIYAR y J. ROSSION, *Oléagineux*, 1977, 32, n° 8-9, p. 377-385.

En 1975 se cultivó treinta y tres variedades de maní de diferentes tipos y procedencias, entre las cuales las variedades resistentes a la contaminación por *Aspergillus flavus* PI 337-394 P y PI 337-409, en el campo en la estación de Darou (Senegal), en condiciones de sequía muy favorables a la contaminación en el suelo. Por cada variedad hubo dos fechas de siembra y dos fechas de cosecha. Se encontró diferencias significativas entre las variedades, desde el punto de vista de los porcentajes de contaminación al cosecharse las vainas por una parte (de 0,8 a 8 %) y las semillas por otra parte (de 0,4 a 4 %). Entre las 10 variedades menos contaminadas figuran los dos PI resistentes, Florunner y 7 variedades seleccionadas en Senegal por su resistencia a la sequía. La prueba biológica de sensibilidad por inoculación artificial realizada en el laboratorio del Museo de París, explica hasta cierto punto los porcentajes de contaminación natural observados. Sin embargo los resultados de la prueba muestran variaciones fuertes y significativas para ciertas variedades, con arreglo a las condiciones de cultivo (fechas de siembra y de cosecha).

Varietal Differences in Groundnut Sensitivity to Contamination by *A. flavus* in the Field and in Artificial Conditions

Ch. ZAMBETTAKIS (1), A. BOCKELEEE-MORVAN (2), F. WALIYAR (3) and J. ROSSION (4)

In a previous study [3] varietal differences in the performance of groundnut in the face of contamination by *Aspergillus flavus* were observed, either in the laboratory or in a field trial conducted in Senegal.

In 1975 a new trial was planted on the Darou Station of the Senegalese Institute for Agronomic Research, with new Senegalese or introduced varieties, amongst them PI 337-394 and PI 337-409, which Mixon [1] found to be the most resistant out of 1,200 varieties tested by artificial contamination, the estimate being made by count of the seeds in which the fungus traversed the testa and developed on the cotyledons, and PI 886 (or US 26), recognized as resistant by Rao [2], contamination being evaluated by analysis of the aflatoxin content of the seeds.

I. — MATERIAL AND METHODS

The trial planted at Darou comprised 33 groundnut varieties of different types (Virginia, large-seed Virginia, Spanish, Valencia) and with a variable cycle. It included two series, one sown normally at the beginning of the rainy season (17th July) and the other sown late (8th August), late sowing and end-of-cycle drought having been recognized already as favourable to contamination of the pods in the soil by *A. flavus*. Each series was divided in two, one lot harvested when well ripened, the other a fortnight before the theoretical date of ripeness in function of the length of cycle of each variety.

The trial was therefore composed of 132 plots, 3 × 6 m, with the exception of certain varieties for which there was insufficient seed to enable the four treatments to be given.

The rainfall was 766 mm, slightly higher than average (716 mm), but irregular in September and October, so that the first sowings also suffered dry periods at the end of the cycle.

Finally, harvesting conditions for the first and second sowing were very similar, as shown by the mean humidity of the shells and seeds on harvesting, measured on a sample of each variety (Table I).

At each sampling, 300 pods of each variety (sometimes more if there was a large p. 100 of empty pods) were sent at once to the laboratory of the Natural History Museum in Paris, wrapped in newspaper which absorbs excess humidity and is mildly germicide. All the pods from each harvest were exposed to the air as soon as they arrived to finish drying. They were examined immediately and the number of *A. flavus* colonies counted by binocular stereoscope.

Once the rate of infection of the outside of the pods was evaluated, they were shelled (all those from the same harvest on the same day), and the number of seeds with visible *A. flavus* colonies on the testa noted at once.

The seeds were left in the air and a month later the contamination was measured, as new colonies invisible on shelling could have developed during natural drying (the first examination on shelling takes place between 10 and 30 days after harvesting according to the samples).

The healthy seeds were then used for the biological test of the extension of the fungus after artificial inoculation. The artificial inoculation test of the seeds was made on 4 replications of 25 healthy seeds per variety and for each of the two dates of harvest at ripeness. For four varieties, Florunner, 55-437, GH 119-20 and PI 337-394 P, it was also made on the seeds harvested a fortnight before ripening.

The seeds were infected by soaking in an aqueous solution of spores 15 days old at a concentration of 400 000 per drop; they were then placed in a Petri dish on water-soaked filter paper (2 cm² per dish of 25 seeds, renewed every other day). The inoculum was made up of a mixture of 4 local *A. flavus* strains producing aflatoxin. Counts of seeds with *A. flavus* colonies started on the 5th day and continued to the 20th day after seeding.

II. — NATURAL CONTAMINATION OF THE PODS

In general, 1 200 pods per variety were examined (300 for each harvest), with certain variations. Table II shows the mean number of *A. flavus* colonies observed, related to 1 000 pods.

Contamination varies considerably according to the varieties, in the ratio of 1 to 10. Ten varieties have a rate of contaminated pods below 30 p. 1 000 : Florunner, 55-437, 47-16, PI 337-394 P, 57-422, 70-112, 73-30, 59-172, PI 337-409 and 73-33. These ten varieties did not differ from each other statistically, all the other varieties having a contamination rate significantly higher than 73-30, which is the least contaminated with 8.3 p. 1 000.

Whilst differences between varieties are large, those between harvesting dates are relatively minor (Table III).

The average rate of contamination is the same for the two lots harvested when ripe; it is lower for the first sowing harvested a fortnight early, higher for the second sowing harvested a fortnight early.

III. — NATURAL CONTAMINATION OF THE SEEDS

About 2 000 seeds per variety were examined (about 500 for each harvesting date), taken from all the pods received and on which the external contamination was examined as above.

The seeds with *A. flavus* colonies were counted, as well as the perfectly healthy ones and those said to be bad (aborted, immature, mouldy, etc.). On shelling, the empty pods were also counted.

The average seed contamination rate for the four harvesting dates (Table IV) varied considerably according to the varieties, in the ratio of about 1 to 10. Ten varieties have a natural contamination rate of less than 10 p. 1 000; they are the same varieties which had already been found to have a very small number of contaminated pods (Fig. 1).

The observations show that the pods which, on shelling, prove to have one or more contaminated seeds usually have visible *A. flavus* colonies on the outside of the shell. On the other hand, all the external colonies on the pod are not found again on the seeds. In effect, for the whole of the samples, we find 42 contaminated pods per 1 000, whilst for the seeds the mean rate of contamination is 31 on the basis of 1 000 pods.

This difference is even greater when it is considered that the 2 or 3 seeds in each pod have a greater chance of being contaminated than one isolated seed, once the fungus has broken through the barrier offered by the shell.

The differences in the rate of seed contamination in function of the harvesting dates are relatively small; the mean contamination rate is very similar for the last three dates and lowest for the first.

If we compare the contamination rate with the moisture content of the seeds on harvesting, the first sampling, which was moister, is also the least contaminated and therefore seems to have benefited from conditions less favourable to contamination in the soil.

The examination of the data by variety shows, however, that the varieties which were very little contaminated had very low moisture contents on harvesting, and vice versa.

The ecological conditions prevailing during the season were such that the four series of samples taken found themselves before harvesting in fairly comparable average contamination conditions. The statistical interpretation of the contamination rates for pods and seeds shows that there are significant differences between varieties in the field.

The correlation between external contamination of the pods (Table II) and that of the seeds (Table IV) is highly significant ($r = 0.90^{***}$), as could be foreseen from examination of the pods and seeds immediately after shelling.

The correlation between the number of bad seeds (Table IV) and the rates of pod and seed contamination is also significant ($r = 0.49^{**}$ and 0.54^{**} respectively), though not so close. This is explained by the fact that the bad seeds include those which were wrinkled and unripe, of which there were a greater number in the harvest made a fortnight before the date of ripening, especially for the 1st sowing, where the rate of seed contamination is lowest.

(1) In charge of Research, C. N. R. S., Cryptogamy Laboratory, Natural History Museum, Paris (L. A. 257 C. N. R. S.).

(2) Annual Oilseeds Department, I. R. H. O., Paris.

(3) Assistant, Cryptogamy Laboratory, Natural History Museum.

(4) Agricultural Engineer I. R. H. O., I. S. R. A. Station, Darou (Senegal).

(5) In the framework of the Ministry of Rural Development/F. E. D. Development Project for Edible Groundnuts in the Sine-Saloum (Senegal).

On the other hand, no significant correlation has been found between the number of empty pods and contamination by *A. flavus*, although the most contaminated varieties are frequently those with a large percentage of empty pods.

IV. — ARTIFICIAL CONTAMINATION TEST

The results of this test are given in Table VII. Wide differences in contamination are observed, five varieties being distinctly less infested (mean rate below 20 p. 100), whether the seeds were from the first or second sowing.

Amongst them are the two varieties mentioned by Mixon : PI 337-394 and PI 337-409, tested by a method similar to ours, but with a pure *A. flavus* strain. It is interesting to note that these two varieties are also resistant to the local strains (Fig. 2).

The third, US 26, has been acknowledged as resistant by Rao, the evaluation being made by analysis of the aflatoxin in the seeds. The other two almost non-susceptible varieties in this test, 55-437 and 73-30, are grown in Senegal, where they have been selected for their drought resistance.

A second group of 7 varieties has a rate of infestation between 20 and 50 p. 100. It includes a semi-late Virginia (73-33), a Valencia (UF 72-513), three long-cycle Virginia (28-206, 47-16 and 70-112), two large-seed Virginia (EH 301-13 and Darou IV).

All the other varieties have a contamination rate above 60 p. 100, some being close to 100 p. 100.

It is observed that on an average the seeds from the second sowing are more infested than those from the first (66.8 p. 100 and 59.2 p. 100 respectively), the difference being significant at 1 p. 100.

Comparing the infestation rate by variety for the two sowing dates, it is noted that for 18 varieties out of the 33 tested there is no significant difference between the first and second sowing, and amongst the 18 are the 5 least sensitive varieties.

Ten varieties prove significantly more sensitive for seeds from the second sowing than for those from the first : Florunner, EH 273-2-15, 47-16, NC 17, Tifton 8, Darou IV, EH 235-2-2, EH 310-9, EH 303-4, EH 282 b 2.

Four varieties, on the contrary, are significantly less susceptible for the seeds from the second sowing : Fla 393-9, EH 301-13, 59-127, 73-33.

For four varieties (Florunner, 55-437, PI 337-394 P, GH119-20) the test was carried out in the same conditions for the four harvesting dates (Table VIII). It is observed that PI 337-394 P when harvested before ripening for the first sowing is notably less sensitive than when ripe, whereas the opposite applies to 55-437, which is significantly much more sensitive in the same conditions.

It is possible that the seeds, very moist at that time, shrank while drying rapidly, which would cause fissures in the testa favouring the penetration of *A. flavus*.

These observations show that the state of the seed at the moment of the test is an important factor, the structure of the testa and its resistance to the penetration of the fungus depending on the growing conditions. The inoculation test should therefore be carried out for preference on seeds grown in the same conditions, to bring out differences in sensitivity between varieties.

This could explain the differences sometimes observed in the classification of certain varieties from one year to another or from one test to another. It might also be considered as an unfavourable factor that a given variety can behave very differently in the inoculation test in function of the growing conditions.

V. — RELATIONSHIPS BETWEEN THE INOCULATION TEST AND CONTAMINATION IN THE FIELD

The inoculation test is quite a practical means of classing the varieties (subject to the incidence of the growing conditions on the sensitivity of certain amongst them). Other factors intervene in the field, in particular the resistance of the shell to penetration by *A. flavus*.

We sought to find out if there were correlations between

the test results (mean of the two harvests at maturity) and the observations of natural contamination. The latter is obviously much smaller, since the maximum rate noted is 15 p. 100 (against 100 p. 100 with artificial contamination).

There is no significant correlation between the number of bad seeds (Table IV) and the test. On the other hand, significant correlations are found between the rate of natural contamination of the pods ($r = + 0.53^{**}$) (Table II) and that of the seeds ($r = + 0.51^{**}$) (Table IV).

In general, the varieties least sensitive on test have a low natural contamination rate. Thus, 55-437, PI 337-394 P, PI 337-409 and 73-30 have a natural contamination rate of less than 1 p. 100. US 26, not very sensitive on test, has a high natural contamination rate on pods and seeds and a large percentage of bad seeds, which indicates very poor adaptation to the environmental conditions at Darou and probably favours penetration by the fungus.

Florunner, on the contrary, proved very sensitive in our tests whereas it was classed by Mixon as relatively insensitive. It has been seen that its susceptibility depends quite a lot on the conditions of cultivation and harvesting, and at Darou it has low natural contamination and a small percentage of bad seeds.

Whilst the biological test does not take account of all the factors entering into resistance to *A. flavus* contamination, it is certainly an essential element in the search for low-sensitivity varieties.

VI. — RELATIONSHIPS BETWEEN THE INOCULATION TEST AND THE STRUCTURE OF THE TESTA

The structure of the testa of the varieties experimented at Darou was studied by examining the surface by scanning electron microscope and transversal sections by photonic microscope [4].

If these observations are compared to the results of the artificial inoculation tests made on the same varieties, it is found that in the group of the 5 least sensitive varieties, 3 presented a cavity-free surface of the top layer of cells and the two others had very small central cavities. Moreover, four of them had no surface splits.

The same comparisons made on other groups of more or less sensitive varieties show that in general those varieties in which the superficial cells have wide, deep central cavities with surface splits are the most contaminated. However, only a limited number of these observations have been made, and this question needs to be studied in greater depth.

VII. — CONCLUSIONS

The experimentation at Darou and the observations made at the French Natural History Museum have shown that there are significant differences between the varieties tested as regards the development of *Aspergillus flavus* on the pods on the one hand and on the seeds on the other.

In conditions very favourable to contamination in the soil (end-of-cycle drought), certain varieties are very little contaminated. The artificial inoculation test, which indicates the resistance of the testa to penetration by the parasite, explains in large measure the differences in natural contamination rates in the field. For certain varieties the results of the test vary considerably in function of the state of the seeds, i. e. of the growing conditions, and it therefore appears necessary to carry it out on seeds grown in identical conditions in order to classify the varieties, and for each variety, on seeds produced in good growing conditions and in difficult ones.

The correlation between the number of bad seeds and the rate of natural contamination confirms that if the varieties are well adapted to the environmental conditions of the regions in which they are grown, the risks of contamination are limited. Thus, it is noted that of the ten least contaminated varieties, the seven Senegalese varieties were chosen for their drought resistance, which may help to explain why certain are little contaminated in the field even though they are sensitive in the artificial inoculation tests.